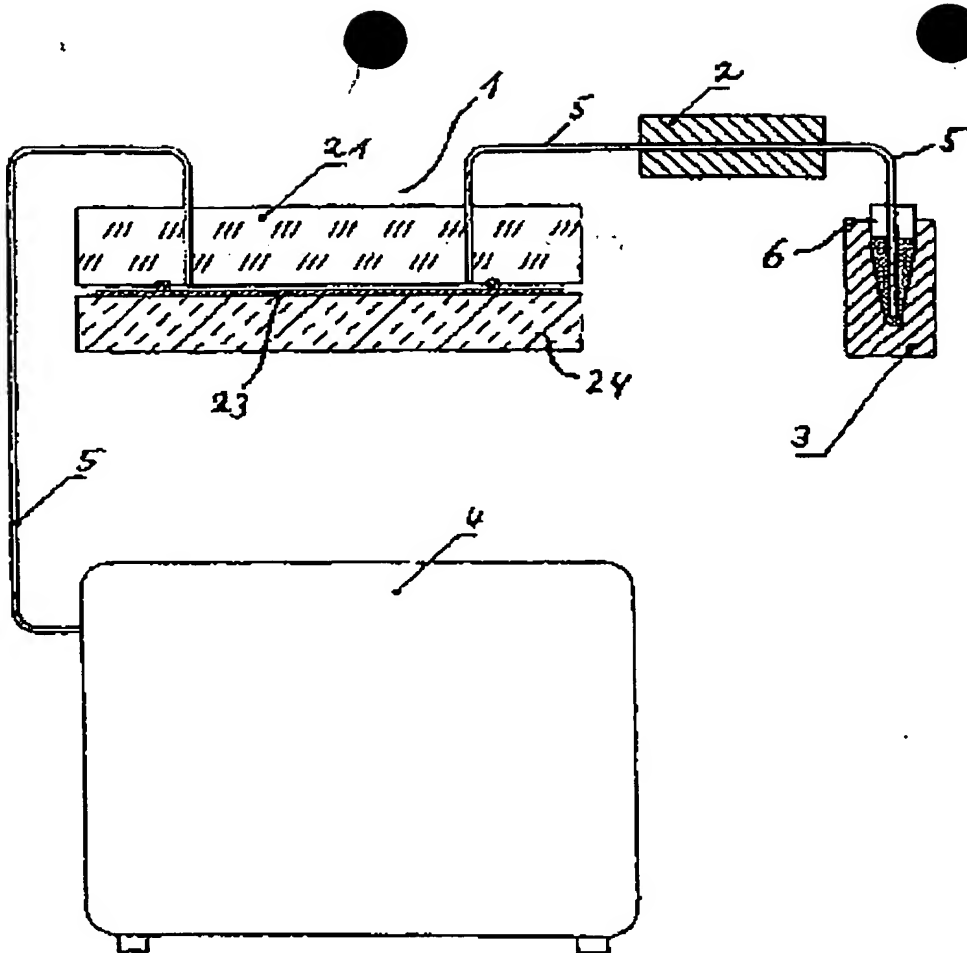


AN: PAT 2001-355187  
TI: Apparatus for hybridizing double-stranded DNA samples on oligomer chips comprises pump which works in both directions, sealed hybridization chamber, cooler and heater connected by pipes  
PN: WO200130489-A2  
PD: 03.05.2001  
AB: NOVELTY - An apparatus for hybridizing double-stranded DNA samples on oligomer chips comprises a pump (4) which works in both directions, a sealed hybridization chamber (1), a cooler (2) and a heater (3) connected by pipes (5). DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is included for a method for hybridizing double-stranded DNA samples on oligomer chips using apparatus as described above in which the probe is first denatured in the heater, cooled, hybridized and then denatured again. The probe is subjected to at least two cycles of this treatment.; The invention is used for hybridizing double-stranded DNA samples on oligomer chips. DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The drawing shows the hybridization apparatus. Hybridization chamber 1 Cooler 2 Heater 3 Pump 4 Pipes 5 Sample container 6 Lid of hybridizing chamber 21 Tempering block 24  
PA: (EPIG-) EPIGENOMICS AG;  
IN: OLEK A; BERLIN K;  
FA: WO200130489-A2 03.05.2001; AU774249-B2 24.06.2004; DE19952723-A1 10.05.2001; AU200121492-A 08.05.2001; EP1230014-A2 14.08.2002; DE19952723-C2 31.10.2002; JP2003533969-W 18.11.2003;  
CO: AE; AG; AL; AM; AT; AU; AZ; BA; BB; BE; BG; BR; BY; BZ; CA; CH; CN; CR; CU; CY; CZ; DE; DK; DM; DZ; EA; EE; EP; ES; FI; FR; GB; GD; GE; GH; GM; GR; HR; HU; ID; IE; IL; IN; IS; IT; JP; KE; KG; KP; KR; KZ; LC; LI; LK; LR; LS; LT; LU; LV; MA; MC; MD; MG; MK; MN; MW; MX; MZ; NL; NO; NZ; OA; PL; PT; RO; RU; SD; SE; SG; SI; SK; SL; SZ; TJ; TM; TR; TT; TZ; UA; UG; US; UZ; VN; WO; YU; ZA; ZW;  
DN: AE; AG; AL; AM; AT; AU; AZ; BA; BB; BG; BR; BY; BZ; CA; CH; CN; CR; CU; CZ; DE; DK; DM; DZ; EE; ES; FI; GB; GD; GE; GH; GM; HR; HU; ID; IL; IN; IS; JP; KE; KG; KP; KR; KZ; LC; LK; LR; LS; LT; LU; LV; MA; MD; MG; MK; MN; MW; MX; MZ; NO; NZ; PL; PT; RO; RU; SD; SE; SG; SI; SK; SL; TJ; TM; TR; TT; TZ; UA; UG; US; UZ; VN; YU; ZA; ZW;  
DR: AT; BE; CH; CY; DE; DK; EA; ES; FI; FR; GB; GH; GM; GR; IE; IT; KE; LS; LU; MC; MW; MZ; NL; OA; PT; SD; SE; SL; SZ; TZ; UG; ZW; AL; LI; LT; LV; MK; RO; SI;  
IC: B01J-019/00; C12M-001/00; C12M-001/34; C12M-001/38; C12M-001/40; C12N-015/09; C12Q-001/68;  
MC: A12-V03C2; B04-C03B; B04-C03C; B04-E01; B11-C08; B12-K04; D05-H10; D05-H12;  
DC: A96; B04; D16;  
FN: 2001355187.gif  
PR: DE1052723 26.10.1999;  
FP: 03.05.2001  
UP: 22.10.2004

**THIS PAGE BLANK** (USPTO)



BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift

⑩ DE 199 52 723 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 12 M 1/34  
C 12 M 1/38  
C 12 Q 1/68

⑺1 Aktenzeichen: 199 52 723.7  
⑺2 Anmeldetag: 26. 10. 1999  
⑺3 Offenlegungstag: 10. 5. 2001

DE 199 52 723 A 1

⑺1 Anmelder:

Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

⑺4 Vertreter:

Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
10119 Berlin

⑺2 Erfinder:

Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE

⑺5 Entgegenhaltungen:

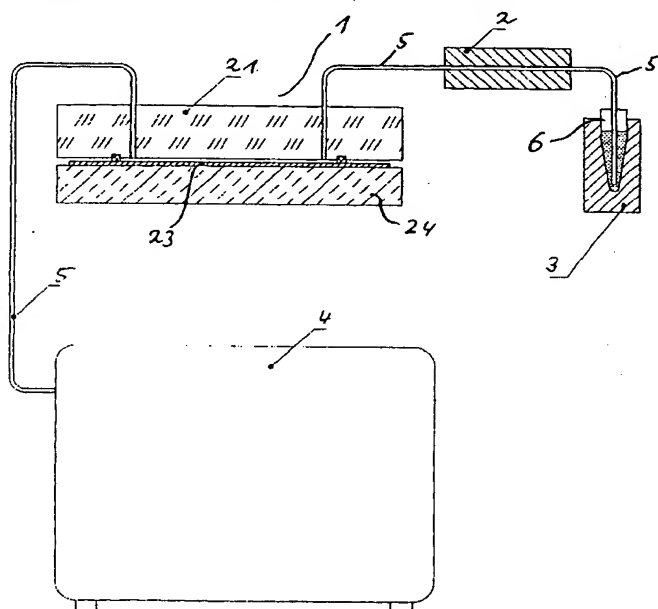
US	59 22 591
US	58 40 573
US	54 66 603
US	53 60 741
US	51 00 775
WO	97 12 063 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑺4 Vorrichtung und Verfahren zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays

⑺5 Beschrieben wird eine Vorrichtung zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays, umfassend mindestens eine in zwei Richtungen fördernde Pumpe (4, 14), eine geschlossene Hybridisierungskammer (1, 11), ein Kühlelement (2, 12) und ein Heizelement (3, 13), wobei die einzelnen Komponenten in der oben genannten Reihenfolge jeweils miteinander durch Flüssigkeiten fördernde Leitungswege (5, 15) verbunden sind.



DE 199 52 723 A 1

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays.

Hybridisierungen von Proben-DNA auf Oligomer Chips, beispielsweise Oligonukleotid-Arrays, werden zum Nachweis bestimmter Sequenzen in der Proben-DNA durchgeführt. Ein möglicher Ansatz, "Sequencing by hybridisation (SBH)", ermittelt dabei sogar die vollständige Sequenz der Proben-DNA oder zumindest großer Teile davon. Alle spezifische Hybridisierungen werden jedoch auch ausgeführt, um bestimmte Veränderungen in der Proben-DNA, z. B. Punktmutationen, nachzuweisen. Die Proben-DNA liegt jedoch, da sie zumeist vorher mittels PCR amplifiziert wurde, in der Regel doppelsträngig vor, damit steht sie im wesentlichen einer Hybridisierung mit den Oligomeren nicht mehr zur Verfügung. Die vorliegende Erfindung beschreibt eine Vorrichtung, die zur effizienten Hybridisierung doppelsträngiger DNA an Oligomer Arrays dient.

Im Stand der Technik sind eine Reihe von Hybridisierungskammern bekannt. So beschreiben die US-A 5,100,775, US-A 5,360,741 oder US-A 5,466, 603 Hybridisierungskammern, welche für die unterschiedlichsten Zwecke und Bedürfnisse angepaßt sind. Derartige Hybridisierungskammern werden inzwischen vielfach kommerziell angeboten, sind aber im Allgemeinen nicht separat temperierbar. Auch sind für die Aufnahme von Objektträgern geeignete Hybridisierungskammern bekannt. Weiterhin gibt es an den Rändern selbstklebende Folien, die durch das Aufkleben auf Objektträger Hybridisierungskammern bilden können. Bekannt ist auch eine pneumatisch ansteuerbare und temperierbare Hybridisierungskammer, bei der die Hybridisierungseigenschaften durch die Bewegung der Hybridisierungsflüssigkeit verbessert sein sollen.

Alle diese Vorrichtungen erfordern jedoch, daß die doppelsträngige Proben-DNA vor der Hybridisierung entweder thermisch denaturiert wird, einer der Stränge selektiv zuvor abgetrennt wird (z. B. kann ein Primer in der PCR mit Biotin markiert sein und in einem nachfolgenden Schritt durch Bindung an Streptavidin selektiv ein Strang aus der Lösung entfernt werden) oder aber durch enzymatische Verfahren ein Strang im Überschuß erzeugt wird, damit die an den Oligomer-Array zu hybridisierenden Abschnitte nicht von komplementären Strängen blockiert werden. Diese Verfahren stellen nicht nur einen zusätzlichen Schritt dar, sondern sie sind auch speziell im Falle des Biotins teuer und im Falle enzymatischer Reaktionen oftmals schlecht reproduzierbar. Sollen beide Stränge jedoch durch den Oligomer-Array nachgewiesen werden, so kommt ohnehin nur die thermische Denaturierung in Frage. Das Problem dabei ist jedoch das sogenannte Reannealing, das heißt daß die komplementären Stränge nach dem Denaturieren wiederum miteinander hybridisieren, was schneller als eine Hybridisierung mit Oligomeren auf dem Chip erfolgen kann. Dieses Problem wird auch durch einmalige Denaturierung nicht gelöst. Wird dagegen in der Kammer denaturiert, so werden bereits an den Oligomer Array hybridisierte DNA-Fragmente ebenfalls wieder abgelöst.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwindet und eine effektive Hybridisierung von doppelsträngigen DNA-Proben ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den abhängigen Unteransprüchen gekennzeichnet.

Die Aufgabe wird also durch eine Vorrichtung zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Ar-

rays (Oligomer-Chips) gelöst, umfassend mindestens eine in zwei Richtungen fördernde Pumpe, eine geschlossene Hybridisierungskammer, ein Kühlelement und ein Heizelement, wobei die einzelnen Komponenten in der oben genannten Reihenfolge jeweils miteinander durch Flüssigkeiten fördernde Leitungswege verbunden sind.

Die hier beschriebene Vorrichtung ermöglicht ein periodisches Denaturieren der DNA-Probe, ohne eine Ablösung bereits an Oligomere hybridisierter DNA zu erzeugen und überwindet damit die im Stand der Technik erwähnten Probleme. Dadurch, daß die DNA-Probe vor dem Aufbringen auf den Chip thermisch denaturiert und dann plötzlich abgekühlt wird, liegt sie bei Kontaktierung mit dem Chip überwiegend in einzelsträngiger Form vor. Damit steht ein großer Teil der ansonsten doppelsträngigen DNA-Probe für Hybridisierungen mit dem Oligomer-Array zur Verfügung. Durch Hin- und Herpumpen der Probenflüssigkeit stellt die Vorrichtung sicher, daß dieser Vorgang so häufig wiederholt wird, bis ein ausreichender Teil der doppelsträngigen DNA-Probe an die Oligomere des Chips hybridisiert hat. Zugleich findet durch diesen Prozeß ein Mischen in der Kammer während der Hybridisierungsphase statt.

Erfindungsgemäß ist bevorzugt, daß die Pumpe eine peristaltische Pumpe, eine Schlauchpumpe oder eine Kolbenpumpe ist. Die Pumpe soll in der Lage sein, kleine Flüssigkeitsmengen präzise in Saug- und Druckrichtung zu fördern. Dies kann erfindungsgemäß auch durch eine dem Fachmann bekannte Schaltung mittels Ventilen, wie Mehrwegventilen erfolgen, welche ihrerseits wieder extern ansteuer- und/oder regelbar sind.

Besonders bevorzugt ist es dabei, daß die Pumpe programmierbar oder durch ein Computer gesteuert ist. Derartige Steuerungen und/oder Computerprogramme sind dem Fachmann an sich bekannt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, daß die Hybridisierungskammer mindestens einen Deckel, mit durch diesen hindurch geführten Ein-/Auslaßkanälen, und einen Temperierblock, mit einem darauf auflegbaren oder festlegbaren Oligomer-Array, umfaßt.

Dabei ist insbesondere bevorzugt, daß weiterhin ein Kühlkörper vorhanden ist, auf welchem der Temperierblock angeordnet ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner eine Vorrichtung, wobei das Volumen der Hybridisierungskammer bei eingelegtem Oligomer-Chip weniger als 200 µl beträgt.

Besonders vorteilhaft ist es, daß die Hybridisierungskammer für die Aufnahme handelsüblicher Objektträger oder Mikroskopobjektträger vorgerichtet ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es auch, daß das Kühlelement den Leitungsweg fest umschließt.

Bevorzugt ist es ferner, daß das Heizelement den Leitungsweg fest umschließt und daß der Leitungsweg mit seinem offenen Ende aus dem Heizelement herausragt. Dabei ist es alternativ bevorzugt, daß das Heizelement ein Probengefäß mindestens teilweise umschließt und das der Leitungsweg mit seinem offenen Ende in die in dem Probengefäß vorhandenen Probenlösung eintaucht und daß dieser Leitungsweg gegebenenfalls bis auf die Innenseite des Bodens des Probengefäßes geführt ist.

Bevorzugt ist es ferner, daß die Leitungswege Schläuche sind und vorzugsweise aus einem inerten Material, Silikonkautschuken, Polytetrafluorethylen, Polyvinylchlorid, Polyethylen und/oder Edelstahl bestehen. Auch andere inerte Materialien kommen in Frage und sind dem Fachmann bekannt.

Ganz besonders bevorzugt ist es, daß die Hybridisierungskammer, das Kühlelement, das Heizelement und der Temperierblock unabhängig voneinander temperierbar sind.

Bevorzugt ist es ferner, daß der Temperierblock der Hybridisierungskammer gleichzeitig als Kühlelement ausgebildet ist.

Es ist weiterhin bevorzugt, daß das Volumen der Leitungswege zwischen dem Heizelement und dem Einlaßkanal der Hybridisierungskammer kleiner als das Volumen der Hybridisierungskammer selbst ist.

Die vorliegende Erfindung wird an Hand der beigefügten Abbildungen näher erläutert.

Es zeigen:

**Fig. 1a** eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in einem ersten Ausführungsbeispiel.

**Fig. 1b** eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in einem zweiten Ausführungsbeispiel und

**Fig. 2** eine perspektivische Ansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Hybridisierungskammer.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine wie in **Fig. 1a/b** schematisierte Vorrichtung zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays (Oligomer-Chips). Sie besteht aus einer geschlossenen und temperierbaren Hybridisierungskammer **1, 11**, einer Pumpe **4, 14**, einem Heizelement **3, 13** und einem Kühlelement **2, 12**, die jeweils miteinander durch Flüssigkeit fördernde Leitungswege **5, 15**, bevorzugt Kunststoffschläuche verbunden sind.

Die Hybridisierungskammer **1, 11** (**Fig. 2**) besteht bevorzugt aus zwei Teilen, einer Schale zur Aufnahme der Oligomer-Arrays **23** und einem Deckel **21**, die bevorzugt durch einen Klappmechanismus aufeinandergedrückt werden können. Im Deckel befindet sich bevorzugt eine Aussparung für eine Dichtung, welche die Seitenwände der Kammer bildet. Der Deckel enthält auch die Durchführungen **22** für die Schlauchanschlüsse **5, 15** oder andere Förderkanäle für Flüssigkeiten. Die Kammer ist bevorzugt durch ein Peltier-Element temperierbar.

Bei der Pumpe handelt es sich bevorzugt um eine nach peristaltischem Prinzip arbeitende Schlauchpumpe oder aber um eine Kolbenpumpe, die zur automatisierten Durchführung des Verfahrens selbst programmierbar ist oder aber bevorzugt durch einen PC angesteuert werden kann. Die Probe wird zyklisch durch die Pumpe bewegt und zuerst im Heizelement denaturiert, im Kühlelement gekühlt und nachfolgend in der Hybridisierungskammer hybridisiert. Danach wird sie wieder in den Heizblock gepumpt und denaturiert. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt und die Vorrichtung kann bevorzugt beliebig viele, mindestens aber zwei solche Zyklen automatisiert hintereinander durchführen.

Das Heizelement wie auch das Kühlelement bestehen bevorzugt aus je einem Metallblock, dessen Temperatur besonders bevorzugt durch ein Peltier-Element geregelt wird. In einer bevorzugten Variante umschließen sowohl das Heizelement wie auch das Kühlelement jeweils einen Schlauch, durch den die Probenlösung gefördert wird. Alternativ kann das Heizelement ein Gefäß aufnehmen, bevorzugt aus Kunststoff bestehend (z. B. "Eppendorf-Cup"). Der Schlauch oder ein anderer Kanal reicht in diesem Fall bis auf den Boden dieses Gefäßes, um dort die Probenflüssigkeit anzusaugen. Die DNA-Probe kann so zum Kühlelement und zur Hybridisierungskammer gefördert werden. In einer weiteren Variante der Erfindung wird kein Kühlelement verwendet, sondern die schnelle Abkühlung der im Heizelement erhitzten Probe erfolgt durch den Kontakt mit der temperierten Hybridisierungskammer.

Die Hybridisierungskammer kann Oligomer-Chips aufnehmen, auf denen Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere (Peptide Nucleic Acids) immobilisiert sind. In einer besonders bevorzugten Variante nimmt die Hybridisierungskammer handelsübliche Objektträger auf, wie sie auch in

der Mikroskopie verwendet werden. Besonders bevorzugt beträgt das Volumen, das die Hybridisierungskammer bei eingelegtem Oligomer-Chip faßt, weniger als 200 µl.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays (Oligomer-Chips), wobei man eine erfindungsgemäße Vorrichtung wie vorstehend beschrieben verwendet und wobei man die DNA-Probe zyklisch durch die Pumpe bewegt und zuerst im Heizelement denaturiert, im Kühlelement kühlt und nachfolgend in der Hybridisierungskammer hybridisiert und dann wieder in dem Heizelement denaturiert, wobei man mindestens zwei solcher Zyklen automatisiert nacheinander durchführt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend eine wie oben beschriebene Vorrichtung zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligonucleotid-Arrays und einen oder mehrere Oligomer-Arrays oder Biochips und/oder Dokumentation zur Verwendung der Vorrichtung und/oder Pufferlösungen zur Durchführung der Hybridisierungen.

#### Bezugszeichenliste

- 1, 11 Hybridisierungskammer
- 2, 12 Kühlelement
- 3, 13 Heizelement
- 4, 14 Pumpe
- 5, 15 Leitungswege
- 6 Probengefäß
- 21 Deckel
- 22 Ein-/Auslaßkanäle
- 23 Oligomer-Array
- 24 Temperierblock
- 25 Kühlkörper

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays (Oligomer-Chips) umfassend mindestens eine in zwei Richtungen fördernde Pumpe (**4, 14**), eine geschlossene Hybridisierungskammer (**1, 11**), ein Kühlelement (**2, 12**) und ein Heizelement (**3, 13**), wobei die einzelnen Komponenten in der oben genannten Reihenfolge jeweils miteinander durch Flüssigkeiten fördernde Leitungswege (**5, 15**) verbunden sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Pumpe (**4, 14**) eine peristaltische Pumpe, eine Schlauchpumpe oder eine Kolbenpumpe ist.
3. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Pumpe (**4, 14**) programmierbar oder durch ein Computer gesteuert ist.
4. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungskammer (**1, 11**) mindestens einen Deckel (**21**), mit durch diesen hindurch geführten Ein-/Auslaßkanälen (**22**), und einen Temperierblock (**24**), mit einem darauf auflegbaren oder festlegbaren Oligomer-Array (**23**), umfaßt.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß weiterhin Kühlkörper (**25**) vorhanden ist, auf welchem der Temperierblock (**24**) angeordnet ist.

6. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumen der Hybridisierungskammer (1, 11) bei eingelegtem Oligomer-Chip weniger als 200 µl beträgt.
7. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungskammer (1, 11) für die Aufnahme handelsüblicher Objektträger oder Mikroskopobjektträger vorge richtet ist.
8. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Kühlelement (2, 12) den Leitungsweg (5, 15) fest umschließt.
9. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Heizelement (3, 13) den Leitungsweg (5, 15) fest umschließt und daß der Leitungsweg (5, 15) mit seinem offenen Ende aus dem Heizelement herausragt.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Heizelement (3, 13) ein Probengefäß (6) mindestens teilweise umschließt und das der Leitungsweg (5, 15) mit seinem offenen Ende in die in dem Probengefäß (6) vorhandenen Probenlösung eintaucht und daß dieser Leitungsweg (5, 15) gegebenenfalls bis auf die Innenseite des Bodens des Probengefäßes (6) geführt ist.
11. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Leitungswege (5, 15) Schläuche sind und vorzugsweise aus einem inerten Material, Silikonkautschuken, Polytetrafluorethylen, Polyvinylchlorid, Polyethylen und/oder Edelstahl bestehen.
12. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungskammer (1, 11), das Kühlelement (2, 12), das Heizelement (3, 13) und der Temperierblock (24) unabhängig voneinander temperierbar sind.
13. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Temperierblock (24) der Hybridisierungskammer (1, 11) gleichzeitig als Kühlelement (2, 12) ausgebildet ist.
14. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumen der Leitungswege (5, 15) zwischen dem Heizelement (3, 13) und dem Einlaßkanal (22) der Hybridisierungskammer (1, 11) kleiner als das Volumen der Hybridisierungskammer (1, 11) selbst ist.
15. Verfahren zur Hybridisierung doppelsträngiger DNA-Proben an Oligomer-Arrays (Oligomer-Chips), wobei man eine Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche verwendet und wobei man die DNA-Probe zyklisch durch die Pumpe bewegt und zuerst im Heizelement denaturiert, im Kühlelement kühlt und nachfolgend in der Hybridisierungskammer hybridisiert und dann wieder in dem Heizelement denaturiert, wobei man mindestens zwei solcher Zyklen automatisiert nacheinander durchführt.

---

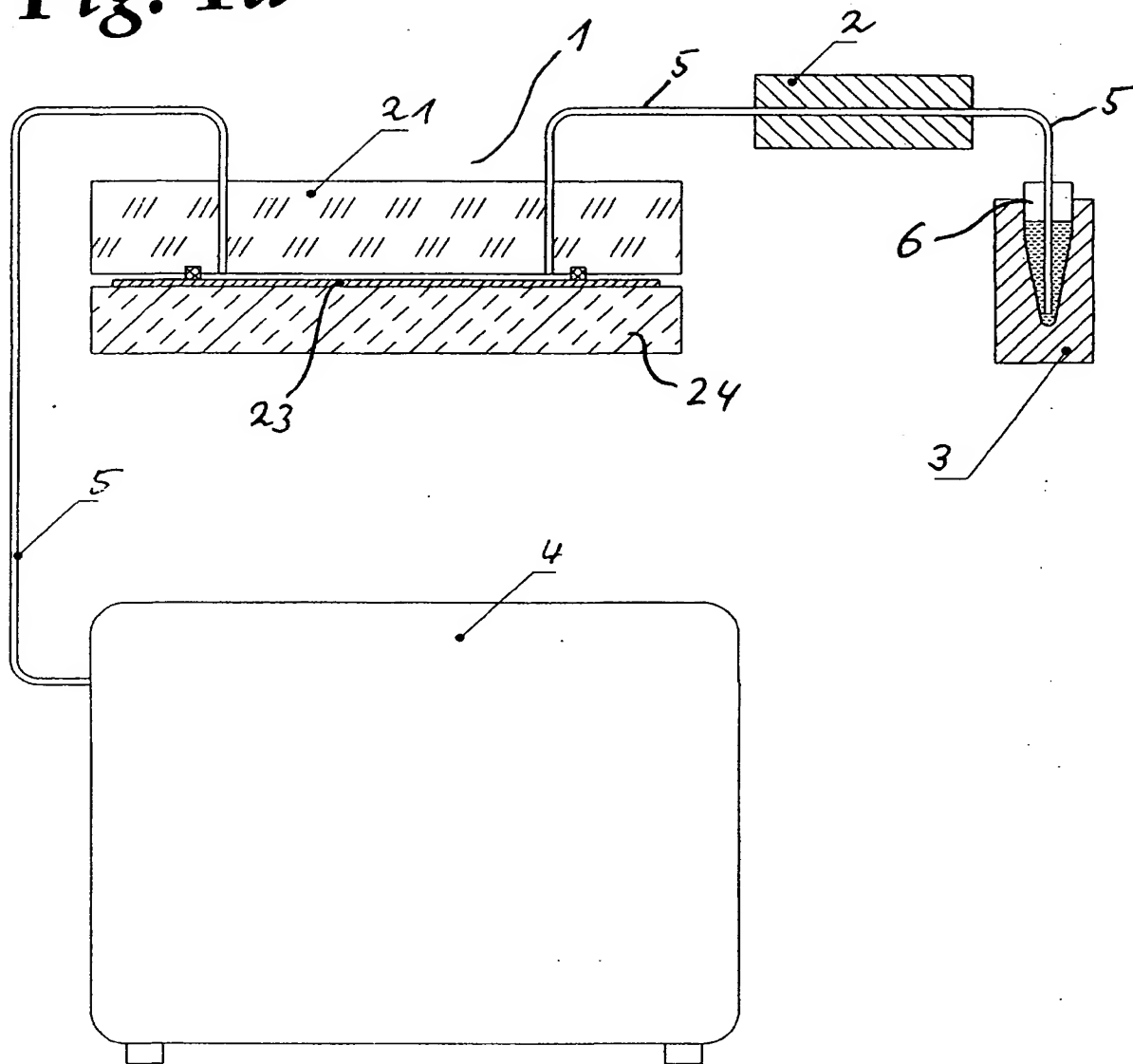
Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

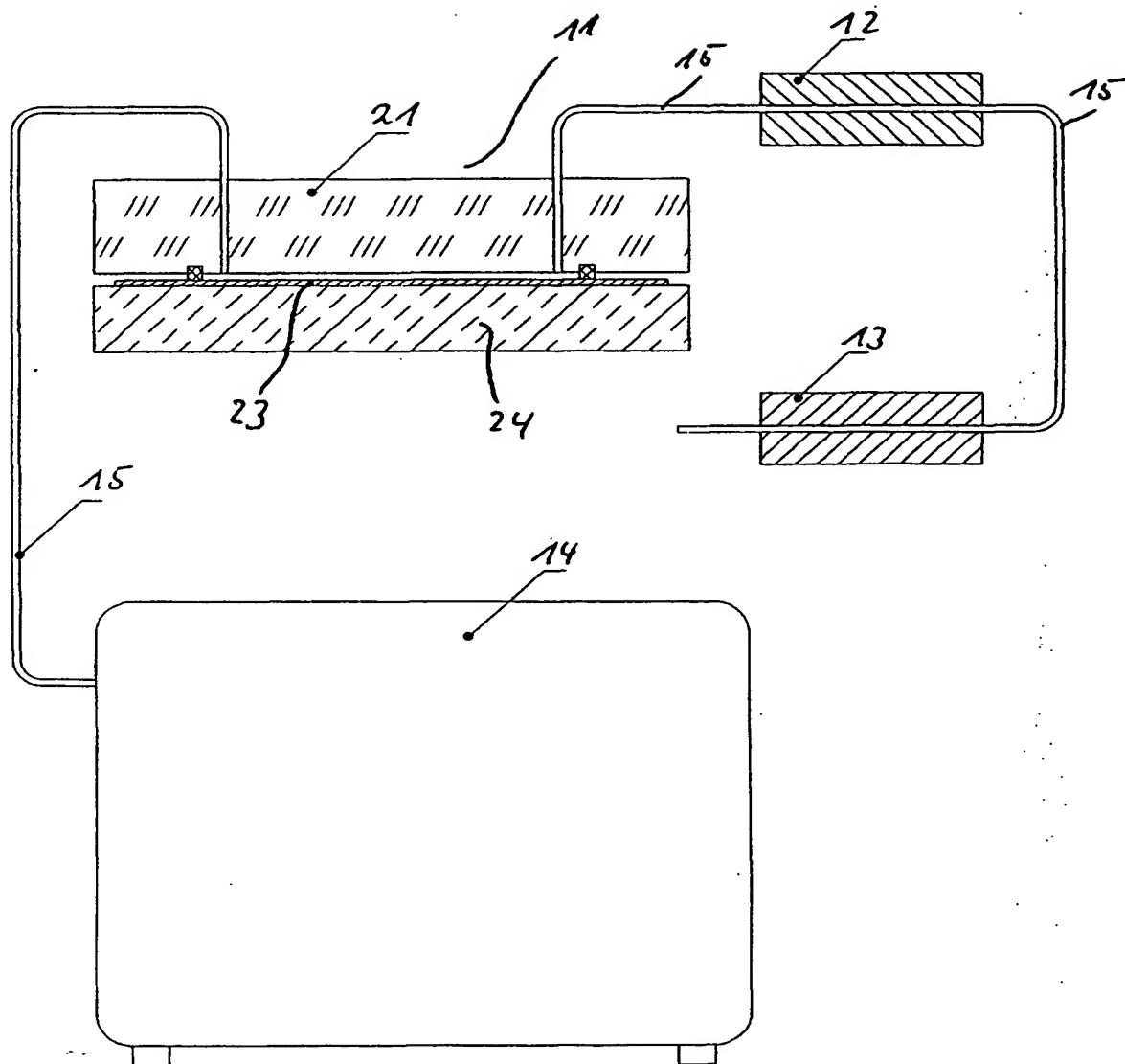


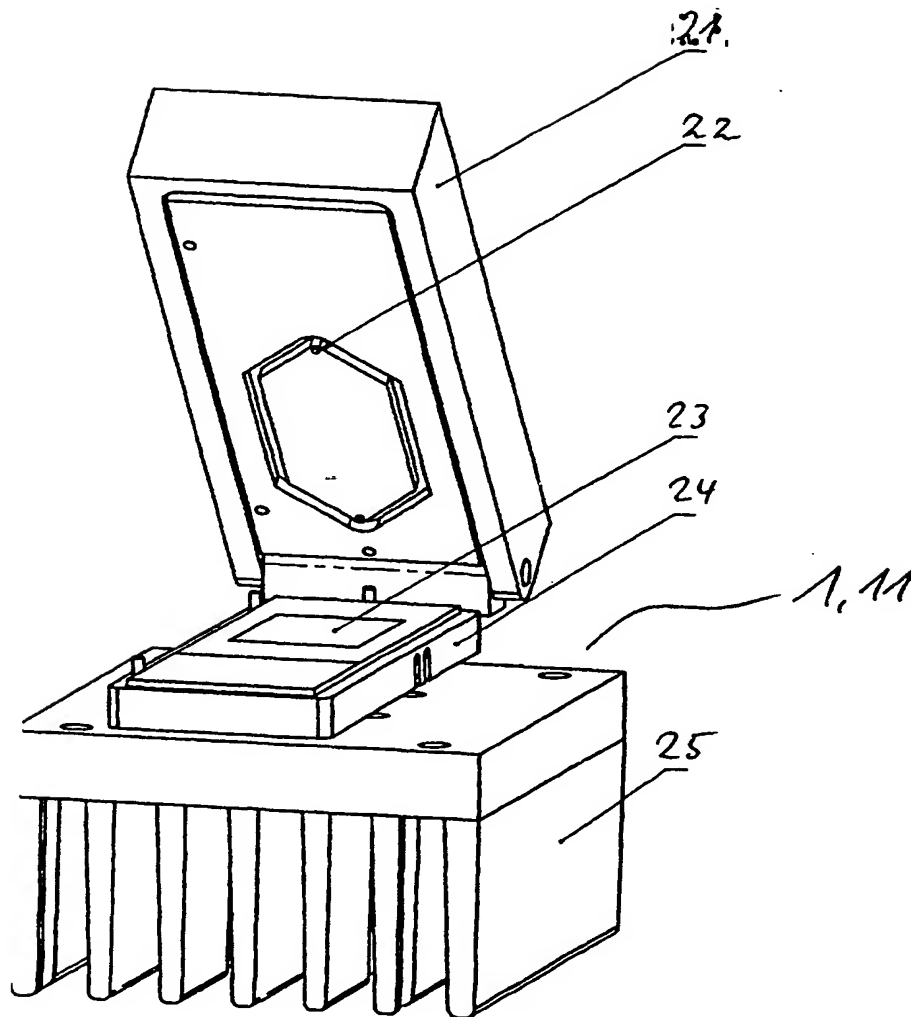
- Leerseite -

*Fig. 1a*



*Fig. 1b*





*Fig. 2*